Aus der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. E. Kern

HB_s-ANTIGEN-NACHWEIS IM MENSCHLICHEN SERUM -VERGLEICH MEHRERER VERFAHREN DER III. GENERATION-

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Arno Endrich
aus Würzburg

Würzburg, den 2. Juli 1980

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. E. Kern

HB_s-ANTIGEN-NACHWEIS IM MENSCHLICHEN SERUM
-VERGLEICH MEHRERER VERFAHREN DER III. GENERATION-

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Arno Endrich
aus Würzburg

Würzburg, den 2. Juli 1980

Referent:	Prof. Dr. med. D. Wiebecke
Korreferent:	Prof. Dr. med. H. A. Kühn
Dekan:	Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	3
Überblick	3
Einzeldarstellung der Testmethoden	4
- Ausria II-125	4
- Hepanostika	7
- Hepanosticon	11
- Auscell	13
- Hepatest	16
III. ERGEBNISSE	21
Praktikabilität	21
- Geräte- und Materialaufwand	21
- Zeitaufwand, Handhabung	21
- Ablesbarkeit	24
Ergebnisse der Verdünnungsreihen	27
Ergebnisse der Screening-Untersuchung	28
- zahlenmäßige Darstellung	28
- vergleichende Gesamtdarstellung	34
IV. BEWERTUNG DER ERGEBNISSE	37
V. ZUSAMMENFASSUNG	40
VI. TABELLEN	41
VII. LITERATURVERZEICHNIS	45

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0132

I. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Das HB_s-Antigen wurde als Serumprotein unbekannter Bedeutung erstmals 1963 von Blumberg im Serum eines australischen Ureinwohners entdeckt und zunächst als "Australia-Antigen" bezeichnet (1). Nachdem bereits 1966 eine deutliche Korrelation dieses Antigens zur Virushepatitis erkannt worden war (2) und 1968/69 die Identität von "Australia-Antigen" und dem von Prince entdeckten "Serumhepatitis-Antigen" angenommen werden konnte (8-10), gelang dann in den folgenden Jahren die genauere Identifizierung dieses Antigens als Hüllprotein des Erregers der Virushepatitis B.

Neben der Bezeichnung "Hepatitis-B-surface-antigen" (HB_s-Ag) werden gelegentlich noch die Synonyma "Serumhepatitis-Antigen" (SH-Ag), "Hepatitis-assoziiertes-Antigen" (HAA) und "Australia-Antigen (Au-Ag) verwendet.

Bedeutung hat das HB_s-Ag vor allem als spezifisches Indikatorantigen für eine Infektion mit dem Erreger der Virushepatitis B und damit auch für die Differenzierung virusinduzierter Lebererkrankungen.

Zum Nachweis des HB_s-Ag wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, die im Grundprinzip alle auf immunologisch-serologischen Reaktionen beruhen. Den einzelnen Entwicklungsperioden entsprechend wurden diese Test-Verfahren nach "Generationen" bzw. "Phasen" geordnet, beginnend mit der Immundiffusion (I. Generation bzw. Phase-I-Test), Überwanderungselektrophorese und Komplementbindungsreaktion (II. Generation bzw. Phase-II-Test) bis hin zu passiver Hämagglutination und Radio- bzw. Enzymimmuntest (III. Generation bzw. Phase-III-Test).

Vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Vergleich von fünf verschiedenen Testverfahren der III. Generation hinsichtlich Empfindlichkeit, Spezifität und Praktikabilität des Nachweises des HB_s-Antigens im menschlichen Serum.

II. MATERIAL UND METHODEN

Überblick

Als Testmaterial dienten 1000 Seren von Patienten der Würzburger Universitätskliniken aus der Zeit Ende 1976/ Anfang 1977, außerdem 517 Seren von Heimkindern des St. Josef-Stifts Eisingen und 283 Seren von Patienten des Lungensanatoriums Münnerstadt je aus der Zeit von 1975. Die Lagerungstemperatur betrug bei allen Seren -20°C.

Die insgesamt 1800 Seren wurden im Suchtest (Screening), die positiven und fraglich-positiven Seren zusätzlich im Spezifitätstest nach folgenden Verfahren und in der angegebenen Reihenfolge untersucht:

Typ	Handelsname	Herstellerfirma
Enzymimmunoassay (EIA)	Hepanostika	Organon
Radioimmunoassay (RIA)	Ausria II-125	Abbott
umgekehrte passive Hämagglutination	Hepanosticon	Organon
" " "	Auscell	Abbott
" " "	Hepatest	Wellcome

(Bei den Seren aus Eisingen/Münnerstadt war die erste Untersuchung mit dem Ausria II-125-Test erfolgt, die übrige Reihenfolge blieb jedoch gleich).

Die Tests wurden nach den jeweiligen Bestimmungen des Herstellers durchgeführt. Die Gebrauchsserumverdünnung im Screening betrug dementsprechend bei Auscell 1:13,5 und

bei Hepatest 1:8. Hepanosticon, RIA und EIA arbeiten mit unverdünntem Serum.
Zusätzlich wurden Empfindlichkeitsmessungen durchgeführt anhand von zwei Serien von Verdünnungsreihen mit verschiedenen HB_s-Ag-Konzentrationsbereichen. Die erste Serie umfaßte den Bereich von 50 ng/ml bis 0,125 ng/ml, die zweite Serie - in feinerer Abstufung - den Bereich von 10 ng/ml bis 0,125 ng/ml. Pro Serie wurde dabei von den Subtypen ad und ay je eine Verdünnungsreihe mit 0,9%iger NACl-Lösung und eine mit negativem (HB_sAg und Anti-HB_sAg-freiem) menschlichen Serum erstellt. Die Referenzseren mit 100 $\pm$ 6 ng HB_s-Ag ad/ml bzw. ay/ml stammten aus dem Hygiene-Institut der Universität Göttingen als dem deutschen Referenzlabor für das Hepatitis-B-Antigen.

Einzeldarstellung der Testmethoden

Ausria II-125

Funktionsprinzip

An Kunststoff (Polystyren)-Kugeln fixiertes Anti-HB_sAg (vom Meerschweinchen) bindet im Serum vorhandenes HB_sAg. Nach Entfernen ungebundenen HB_sAg durch Waschen der Kugeln wird J^{125}-markiertes, menschliches Anti-HB_sAg (ein gegen das HB_sAg gerichteter Antikörper menschlicher Herkunft) hinzugegeben, das nun mit dem Ak-Ag-Komplex auf der Kugel unter Bildung eines AK-Ag-Ak-"Sandwich" reagiert. Ungebundener markierter Antikörper wird durch Waschen entfernt. Die anschließend in einem Gamma-Zähler gemessene radioaktive Strahlung der Kugel ergibt indirekt den Nachweis für das Vorhandensein von HB_sAg im betreffenden Serum. Im Spezifitätstest werden durch unmarkiertes Anti-HB_sAg die Reaktionsstellen des an die Kugeln gebundenen HB_sAg besetzt,

sodaß für die im zweiten Schritt zugegebenen markierten Antikörper keine Bindungsmöglichkeit mehr besteht und sie zum größten Teil wieder ausgewaschen werden, wodurch die Impulsrate stark abfällt. Durch Zugabe von Negativ-Kontrollserum zu einer zweiten Probe des gleichen Serums werden dagegen keine Reaktionsstellen blockiert, die später hinzugegebenen markierten Antikörper können ungehindert reagieren und es resultiert eine hohe Impulsrate wie zuvor im Screening.

Benötigtes Material und Geräte

Ausria II-125-Testpackung, erhältlich für 100, 500 oder 1000 Bestimmungen.

Ausria II-125-Neutralisations-Testpackung

Absaug-Waschanlage, nach Möglichkeit 5-kanalig (bei vorliegender Arbeit wurde Pentawash II verwendet)

Zählgerät für Gammastrahlung

Für die Durchführung des Testes wird ein für den Umgang mit radioaktivem Material (Problem der Abschirmung, Entsorgung etc.) geeigneter Arbeitsplatz benötigt.

Testdurchführung

Vom Hersteller werden drei Möglichkeiten angegeben, die sich nur durch unterschiedliche Dauer der Inkubationszeiten unterscheiden:

Methode A erste Inkubation 2 h bei 45°C
zweite Inkubation 1 h bei 45°C

Methode B erste Inkubation 12 h - 20 h bei Raumtemperatur
zweite Inkubation 1 h bei 45°C

Methode C erste Inkubation 30 min bei 45°C
zweite Inkubation 15 min bei 45°C
-laut Hersteller geringere Empfindlichkeit und Spezifität.

In vorliegender Arbeit wurde nach Methode A verfahren. Dabei sind folgende Schritte durchzuführen:

1. In jede Vertiefung der Inkubationsplatte wird eine antikörperbeschichtete Kugel gegeben.
2. Zugabe von 200 µl Serum je Vertiefung
   dazu pro Lauf in 7 Vertiefungen negatives Kontrollserum und in 3 Vertiefungen positives Kontrollserum
3. Platten bedecken und für 2 h bei 45°C ($\pm$ 1°) in Wasserbad geben (erste Inkubation)
4. Vertiefungen absaugen und waschen
5. Zugabe von 200 µl J^{125}-markierten Antikörper pro Vertiefung
6. Platte abdecken und für 1 h in Wasserbad mit 45°C ($\pm$ 1°) geben (zweite Inkubation)
7. Vertiefungen erneut absaugen und waschen
8. Kugeln in Zählröhrchen übertragen
9. Zählröhrchen innerhalb von 24 h in Zählgerät geben. Pro Röhrchen wird die Impulsrate einer Minute gemessen.
   Als positiv zu bewerten ist das Ergebnis, wenn die Impulsrate wenigstens das 2,1-fache des negativen Mittelwertes beträgt.

Der Test ist nur dann als gültig anzusehen, wenn der Mittelwert der positiven Kontrollen mindestens das 5-fache des negativen Mittelwertes ergibt.

Die Spezifität positiver Ergebnisse wird im Bestätigungstest überprüft, der sich in nur drei Punkten vom Screening-Test

unterscheidet:

1. Jede Serumprobe wird in vier verschiedene Vertiefungen gegeben
2. Vor Zugabe des J^{125}-markierten Antikörpers (im Screening Schritt 5) erfolgt eine zusätzliche Inkubation von 1 h bei 45°C mit unmarkiertem Antikörper bzw. negativem Kontrollserum in je zwei Vertiefungen einer Probe.
3. Die Inkubation mit dem J^{125} markierten Antikörper (im Screening Schritt 6) beträgt 3 h.

Als wahr-positiv gilt die Serumprobe dann, wenn die Impulsrate durch Zugabe des unmarkierten Antikörpers um mindestens 5o% vermindert wird.

Hepanostika

Funktionsprinzip

Der Hepanostika-EIA arbeitet wie der Ausria-Test nach dem Sandwichprinzip. Als Festphase dienen dabei jedoch antikörperbeschichtete Vertiefungen einer Mikrotiterplatte und der zweite, lösliche Antikörper ist enzymmarkiert (Meerrettichperoxydase). Eine positive Reaktion wird dann anhand einer Enzymreaktion angezeigt, die bei Zugabe des entsprechenden Substrates (Orthophenylendiamin) abläuft und zu einer gelb-orange Färbung führt. Diese wird entweder mit blossem Auge abgelesen oder mit einem Kolorimeter als Extinktion gemessen. Als Antikörper wird Schaf-Anti-HB_sAg verwendet.
In der Spezifitätsprüfung wird, wie beim Ausria-Test, bei der betreffenden Serumprobe in einem ersten Ansatz die Reaktion des gebundenen HB_sAg mit dem markierten Antikörper durch Blockierung mit unmarkiertem Antikörper verhindert, in einem zweiten Ansatz dagegen durch negatives Kontrollserum nicht

beeinflußt. Daneben läuft noch ein dritter Ansatz mit, dem weder unmarkierter Antikörper noch negatives Kontrollserum zugegeben wird.

Benötigtes Material und Geräte

Hepanostika-Testpackung für 5 x 110 Bestimmungen. Die darin enthaltenen 5 antikörperbeschichteten Mikrotiterplatten haben jeweils 110 Vertiefungen, ausreichend für 100 Tests und die erforderlichen Kontrollen.

Absaug-Wasch-Vorrichtung mit 0,3 ml Flüssigkeitsabgabe bzw. spezielles Absaug-Wasch-Gerät, das auch bei vorliegender Arbeit verwendet wurde.

11-Kanal-Mikropipette mit verstellbaren Volumina.

Testdurchführung

1. Zugabe von je 100 µl Serum pro Vertiefung der Mikrotiterplatte.
   Dazu pro Lauf eine negative und eine der beiden positiven Kontrollen zufügen (bei vorliegender Arbeit wurden beide positiven Kontrollen zugegeben).
2. Platten abdecken und 2 h bei 37°C oder 16 h - 24 h bei Umgebungstemperatur inkubieren (zweckmäßigerweise über Nacht)
3. Vertiefungen absaugen und 3 x waschen
4. Zugabe von 100 µl Konjugat (=enzymmarkierter Antikörper) pro Vertiefung.
5. Inkubation für 24 h bei 37°C
6. Vertiefungen absaugen und 4 x waschen
7. Zugabe von 100 µl Substratlösung pro Vertiefung (Herstellung und Handhabung bei reduziertem Licht)

8. Inkubation für 50 Min. bei 18° - 25°C im Dunkeln
9. Nach exakt 50 Min.$^{+}_{-}$ 30 Sek. Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µl 4 N H_2SO_4 pro Vertiefung stoppen
10. Ablesung mit bloßem Auge auf Lichtbox mit Tageslichtspektrum
    Gelbliche Färbung intensiver als die der Negativkontrolle wird als positiv bewertet, gleiche oder geringere Färbung als negativ.

Wenn die Positiv-Kontrollen nicht von der Negativ-Kontrolle unterscheidbar sind, ist der Test ungültig.

Der Spezifitätstest wird bis auf folgende zusätzliche Schritte wie der Screening-Test durchgeführt:

1. Jedes Serum wird in drei Vertiefungen gegeben - bei Verwendung der Absaug-Wasch-Anlage untereinander.
2. Nach der ersten Inkubation (Schritt 2 im Screening) werden zwei der Vertiefungen abgesaugt und gewaschen.
3. Zugabe von 4 Tropfen unmarkierten Antikörper in die eine, von 4 Tropfen Kontrollflüssigkeit (=negatives Serum) in die andere Vertiefung.
4. Inkubation für 2 h bei 37°C - mit Schritt III des Screening-Tests beginnend weiterarbeiten.

Aus der Kombination der Ergebnisse in den 3 Vertiefungen ergibt sich dann die Aussage: wahr-positiv, falsch-positiv, negativ, ohne Beweiskraft.
Entscheidend für ein positives Resultat ist dabei eine deutliche Farbabschwächung in der Vertiefung mit dem unmarkierten Antikörper.

Die drei nachfolgenden Testmethoden funktionieren alle nach dem Prinzip der passiven umgekehrten Hämagglutination:
An Erythrozyten gebundenes Anti-HB_sAg reagiert mit im Serum vorhandenen HB_sAg, wordurch die normale Sedimentation der Erythrozyten gestört wird. Es resultieren je nach Art des bei der betreffenden Testmethode verwendeten Reaktionsgefäßes (U- bzw. V-förmiger Boden) unscharfe Punkte oder verschwommene, unregelmäßig gezackte Ringe bzw. homogener Zellrasen.

Abgesehen von der unterschiedlichen Abstammung der Erythrozyten (Mensch, Schaf, Truthahn) und Antikörper (Meerschweinchen, Schaf, Pferd) und der Verwendung von Sedimentationsröhrchen oder Mikrotiterplatten unterscheiden sich die Testmethoden hauptsächlich im Aufbau der Spezifitätsprüfung:

Im Hepanosticon-Test sollen unspezifisch-positive Reaktionen durch Absorption des Testserums mit Anti-HB_sAg-freiem Ig beschichteten Erythrozyten ausgeschaltet werden.

Im Hepatest läuft die Spezifitätsprüfung zweistufig ab:
In einer ersten Stufe wird anhand je einer Serumverdünnungsreihe die Agglutinationswirkung gegenüber den sensibilisierten d. h. Anti-HB_sAg beschichteten Erythrozyten (Testzellen) des Screening verglichen mit der Agglutinationswirkung gegenüber Anti-HB_sAg- freiem Ig beschichteten Erythrozyten (= Kontrollzellen).
In der zweiten Stufe, deren Hauptprinzip der Neutralisationsversuch ist (Agglutinationshemmung mit Anti-HB_sAg), wird mit absorbiertem Serum gearbeitet. Pro Serumprobe werden drei Ansätze durchgeführt: einer mit Anti-HB_sAg und Testzellen, ein zweiter mit normalem Pferdeserum und

Testzellen und ein dritter mit normalem Pferdeserum und Kontrollzellen.

Der Spezifitätsnachweis im Auscell-Test läuft ebenfalls als Neutralisationsversuch ab und beruht auf dem Prinzip der Agglutinationshemmung mit spezifischem menschlichen Anti-HB_sAg, durchgeführt anhand je einer Serumverdünnungsreihe mit menschlichem Anti-HB_sAg bzw. normalem menschlichen Plasma und den Testzellen des Screening.

Hepanosticon

Benötigtes Material und Geräte

Hepanosticon-Testpackung mit lyophilisierten Schaferythrozyten, beschichtet mit Schaf-Anti-HB_sAg. Menge eines Röhrchens ausreichend für 20 Tests.
Abpackung in Mengen zu 5 x 20 bzw. 50 x 20 Tests.
Absorbensreagenz, bestehend aus lyophilisierten Schaferythrozyten beschichtet mit Anti-HB_sAg-freiem Schaf-Ig.
Abpackung 25 Röhrchen, ausreichend für je 2 Tests.

Sedimentationsröhrchen mit U-förmigem Boden
Ableseständer mit Bodenspiegel

Testdurchführung

1. Resuspendierung der lyophilisierten Anti-HB_sAg beschichteten Schaferythrozyten mit 10,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung pro Röhrchen - schütteln bis Lösung homogen, innerhalb einer Stunde verbrauchen.
2. Zugabe von 500 µl dieser Erythrozytensuspension in jedes der Sedimentationsröhrchen im Ableseständer

3. Einpipettieren von 10 µl Serum pro Sedimentationsröhrchen.

4. Ständer mit den Röhrchen schütteln bis Suspension homogen

5. Ablesung nach 3stündiger, vibrationsfreier Inkubation bei Raumtemperatur (15°-25°C) nicht im direkten Sonnenlicht.

positiv:	Boden des Sedimentationsröhrchens von einheitlichem Zellrasen bräunlicher Erythrozyten bedeckt
schwach bzw. fraglich-positiv:	große, unscharf in einen zentralen Zellrasen übergehende Ringe, häufig gezackt
negativ:	scharf begrenzte Ringe

Zur Ausschaltung unspezifisch positiver Reaktionen sollen alle positiv bzw. fraglich-positiv reagierenden Seren folgender Absorptionsbehandlung unterworfen werden:

1. Resuspendierung des Absorbensreagenz mit 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung pro Röhrchen - homogenisieren

2. pro Serum 5 ml dieser Suspension 5 Min. bei 1200 x g zentrifugieren - Überstand verwerfen

3. Zugabe von 10 µl Serum und 100 µl 0,9%iger NaCl-Lösung - homogenisieren

4. Inkubation bei 37°C für 1 h, dabei nach 30 und 60 Min. homogenisieren, anschließend Inkubation bei 2°-8°C für 16-20 h

5. Zugabe von 300 µl 0,9%iger NaCl-Lösung - homogenisieren - 5 Min. bei 1200 x g zentrifugieren.
6. Überstand in Sedimentationsröhrchen übertragen
7. Zugabe von 100 µl der in 1/5 der üblichen Menge resuspendierten sensibilisierten Schaferythrozyten - homogenisieren.
8. Ablesung nach 3stündiger Inkubation wie im Screeningtest beschrieben.

Auscell
=======

Benötigtes Material und Geräte

Auscell-Testpackung mit lyophilisierten menschlichen Erythrozyten, beschichtet mit Meerschweinchen-Anti-HB_sAg
Abpackung für 110, 450 oder 1800 Bestimmungen
Mikrotiterplatten mit V-förmiger Vertiefung (Typ Linbro IS-MVC-96)
- sind in der Testpackung bereits enthalten.
Testsatz für Spezifitätsanalyse, enthält Anti-HB_sAg vom Menschen und rekalzifiziertes, Anti-HB_sAg und HB_sAg-freies menschliches Plasma
Abpackung für 30 Bestimmungen
25 µl Mikrodiluter

Testdurchführung

Der Test wird durchgeführt in Mikrotiterplatten mit 96 V-förmigen Vertiefungen ausreichend für 94 Tests und je eine Positiv-Negativ-Kontrolle

1. Resuspendierung der lyophilisierten, Anti-HB_sAg beschichteten Erythrozyten mit der auf dem Röhr-

chen angegebenen Menge an Lösungsmittel (in Testpackung enthalten), - homogenisieren ohne zu schütteln

2. Mit der beigefügten Tropfpipette Zugabe von 25 µl Pufferlösung je Vertiefung der Mikrotiterplatte

3. Einpipettieren von 2 µl Serum pro Vertiefung - in eine Vertiefung Positiv-Kontrolle, in eine Vertiefung Negativ-Kontrolle (Pufferlösung) geben - durch seitliches Antippen der Platten Inhalt der Vertiefungen mischen.

4. Zugabe von 25 µl der Erythrozytensuspension (unmittelbar vor Gebrauch homogenisieren) mit der beigefügten Tropfpipette

5. Platte abdecken und durch seitliches Antippen erneut homogenisieren

6. Nach Inkubation von 1 1/2 h - 24 h, vibrationsfrei und bei Raumtemperatur, Ablesung auf Ablesegerät mit Bodenspiegel (bei vorliegender Arbeit erfolgte die Ablesung auf einer Lichtbox)

   positiv: unscharfer Punkt, vergrößerter Punkt mit hellerer unregelmäßiger Peripherie, großer, heller, verschwommener Knopf mit unregelmäßiger Peripherie, größerer Zellrasen.

   negativ: scharfer, dichter Punkt (Knopf) von Erythrozyten.

Damit der Test als gültig angesehen werden kann, müssen Positiv- und Negativ-Kontrollen entsprechend ausfallen. Die übrige Ablesung orientiert sich am Agglutinations- bzw. Sedimentationsmuster der Kontrollen.
Alle im Screening auffälligen Seren müssen in der Spezi-

fitätsanalyse nachgeprüft werden. Dabei werden pro Serum 2 Reihen von Vertiefungen senkrecht nebeneinander benötigt.
Nach Resuspendierung der Anti-HB_sAg beschichteten Erythrozyten wie im Screening-Test beschrieben, werden folgende Schritte durchgeführt:

1. Zugabe von 25 µl Normal-Plasma in oberste Vertiefung der ersten Reihe, von 25 µl Anti-HB_sAg in oberste Vertiefung der zweiten Reihe.
2. Einpipettieren von 25 µl Serum in die beiden obersten Vertiefungen.
3. Mischen durch Antippen der Platten und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Zugabe von 25 µl Pufferlösung zu den restlichen Vertiefungen beider Reihen.
5. Mit 25 µl-Mikrodiluter Erstellen einer Verdünnungsreihe, ausgehend jeweils von den obersten Vertiefungen (1:2 Verdünnung) bis hinunter zur vorletzten Vertiefung der Platte (=Verdünnung 1:128) - die untersten Vertiefungen enthalten nur Pufferlösung und dienen als Negativ-Kontrolle
6. Mit Tropfpipette Zugabe von 25 µl der resuspendierten Erythrozyten zu allen Vertiefungen der beiden Verdünnungsreihen mit Ausnahme der obersten Vertiefungen
7. Platten abdecken - durch Antippen mischen und inkubieren wie im Screening-Test beschrieben.
8. Ablesung nach 1 1/2 h - 24 h:
   positiv: der Titer in der Verdünnungsreihe mit Normal-Plasma muß mindestens 1:8
   und

der Titer in der Verdünnungsreihe mit Anti-HB_sAg mindestens 4-fach niedriger sein

Liegen diese Titer beide bei 1:64 oder darüber, so muß der Spezifitätstest in größerer Verdünnung wiederholt werden.

Der Test ist nur dann gültig, wenn die Negativ-Kontrolle (unterste Vertiefungen auf der Platte) deutliche, scharfe Punkte ergibt und die Positiv-Kontrolle (wird wie das zu untersuchende Serum verarbeitet) den Bedingungen für positiv entspricht.

Hepatest
========

Benötigtes Material und Geräte

Hepatest-Testpackung mit lyophilisierten Truthahn-Erythrozyten, beschichtet mit Pferde-Anti-HB_sAg (=Testzellen) und mit lyophilisierten Truthahn-Erythrozyten, beschichtet mit Anti-HB_sAg-freiem Pferde-Ig (=Kontrollzellen); außerdem sind in der Testpackung Pufferlösung und positives und negatives Kontrollserum enthalten.
Abpackung für 200 oder 1000 Bestimmungen

Testsatz für Spezifitätsanalyse, enthält lyophilisierte 10%ige Suspension von Kontrollzellen zur Absorption, Pferde- Anti-HB_sAg und normales Pferdeserum.

U-Mikrotiterplatten (entsprechend früheren Erfahrungen des Robert-Koch-Institutes des Bundesgesundheitsamtes Berlin wurden Greiner-Platten Typ M 220/24 A System Cooke verwendet)
25 µl Mikrodiluter

Testdurchführung

Der Test wird durchgeführt in Mikrotiterplatten mit 96 U-förmigen Vertiefungen, ausreichend für 46 Bestimmungen und je eine Positiv- und Negativ-Kontrolle.

1. Resuspendierung der lyophilisierten Testzellen mit der auf dem Röhrchen angegebenen Menge dest. Wassers.

2. Mit Tropfpipette Zugabe von 75 µl Pufferlösung in die 1., 3., 5., 7., und von 25 µl Pufferlösung in die 2., 4., 6., 8., waagrechte Reihe der Mikrotiterplatte

3. Einpipettieren von je 25 µl Serum in die Vertiefungen der 1., 3., 5., und 7. Reihe der Mikrotiterplatte (ergibt Serumverdünnung 1:4) - außerdem in je eine Vertiefung Positiv -bzw. Negativ-Kontrolle geben.

4. Mit 25 µl Mikrodiluter Übertragung der 1:4-Verdünnung in die jeweils nächst tiefere (2., 4., 6., 8.) Reihe zur 1:8 Verdünnung.

5. Zugabe von 25 µl homogenisierter Testzellsuspension zu jeder 1:8 Verdünnung.
   Durch leichtes Schütteln der Mikrotiterplatten Inhalt der Vertiefungen mischen - Platten abdecken.

6. Nach Inkubation von 30-60 Min. bei Raumtemperatur Ablesung auf einer Lichtbox

   positiv: ausgedehnter, homogener Zellrasen evtl. umgeben von einem unvollständigen, unregelmäßig gezackten ringähnlichen Saum

schwach bzw. fraglich-positiv:	Zellrasen geringerer Ausdehnung umgeben von einem dichteren meist unregelmäßig gezackten Ring größeren Durchmessers
negativ:	dichter, gleichmäßiger Ring oder Knopf

Der Test ist nur dann gültig, wenn Positiv- und Negativ-Kontrolle entsprechend ausfallen.

Die übrige Auswertung erfolgt im Vergleich mit dem Agglutinationsmuster der Kontrollen.

Die Spezifität positiver bzw. fraglich-positiver Ergebnisse wird in zwei Stufen geprüft:
In der ersten Stufe werden für jede Serumprobe zwei Verdünnungsreihen von je 1:2 bis 1:512 (Zweierabstufung) nebeneinander in zwei Reihen von Vertiefungen der Mikrotiterplatte erstellt. Beginnend mit der 1:4 Verdünnung werden je Vertiefung zur ersten Reihe 25 µl Testzellen, zur zweiten Reihe 25 µl Kontrollzellen gegeben. Nach Mischen und Abdecken erfolgt nach 30-60 Min. die Ablesung. Dabei gilt ein Serum dann als positiv, wenn der Agglutinationstiter in der Testzellreihe mindestens 4-fach höher ist als in der Kontrollzellreihe. Gleiche Titer in Test- und Kontrollreihe sprechen für eine unspezifische Reaktion. Die endgültige Abklärung erfolgt in der zweiten Stufe der Spezifitätsprüfung im Hämagglutination-Hemmtest. Für diesen Test müssen alle Seren, die in der ersten Stufe in der Kontrollzellreihe eine Agglutination zeigten, zunächst folgender Absorptionsbehandlung unterzogen werden:

1. Resuspendierung der 10%igen Kontrollzellsuspension der Spezifitätstestpackung mit dest. Wasser.
2. 300 µl dieser Suspension und 100 µl des zu absorbierenden Serums in ein Zentrifugenglas geben und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Zentrifugieren und Überstand (entspricht Verdünnung 1:4) in ein Reagenzglas übertragen.

Die zweite Stufe der Spezifitätsprüfung läuft dann folgendermaßen ab:

1. Für jede Serumprobe werden mit Pufferlösung drei Verdünnungsreihen parallel zueinander in drei Reihen der Mikrotiterplatte erstellt und zwar bis zu der Verdünnungsstufe, die um den Faktor 8 höher ist als der in der ersten Stufe erhaltene Titer der Testzellreihe (=Gebrauchsverdünnungsstufe). Lag dieser Titer bei 1:32 oder darunter, wird mit unverdünntem Serum gearbeitet.
   Die Serummenge in jeder Vertiefung soll 25 µl betragen (bzw. Gesamtmenge einschließlich Verdünnung).
2. Zugabe von 25 µl Pferde-Antiserum zur ersten Vertiefung der Gebrauchsverdünnungsstufe.
3. Zugabe von 25 µl normalem Pferdeserum zur zweiten und dritten Vertiefung der Gebrauchsverdünnungsstufe.
4. Zugabe von 25 µl Testzellen zur ersten und zweiten Vertiefung.
5. Zugabe von 25 µl Kontrollzellen zur dritten Vertiefung.

6. Durch leichtes Schütteln der Platte Inhalt der Vertiefungen mischen, abdecken, bei Raumtemperatur inkubieren und nach 1/2 h - 1 h ablesen nach folgendem Schema:

	1. Vertiefung	2. Vertiefung	3. Vertiefung
positiv	Ring-o.Knopfform der Zellen	Zellrasen	Ring-o.Knopfform der Zellen
negativ	Ring-o.Knopfform der Zellen	Ring-o.Knopf-form d.Zellen	Ring-o.Knopfform der Zellen
falsch positiv	Zellrasen	Zellrasen	Ring-o.Knopfform der Zellen

Zeigen alle drei oder die zweite und dritte Vertiefung einen Zellrasen, muß das betreffende Serum nochmals nachgetestet werden.

III. ERGEBNISSE

P r a k t i k a b i l i t ä t

Geräte- und Materialaufwand

Zur Testdurchführung werden außer der jeweiligen Testpackung bei keiner der vorgestellten Methoden besondere Reagenzien benötigt.

An Geräten müssen außer der üblichen Laboreinrichtung für den Hepanosticon-Test ein spezieller Ablesesständer und für den Hepatest 25 µl - Mikrodiluter zur Verfügung stehen. Beim Auscell-Test werden Mikrodiluter nur bei der Spezifitätsanalyse benötigt.
Die drei Verfahren der umgekehrten passiven Hämagglutination lassen sich somit ohne größere Investitionen in jedem Labor durchführen.

Für den Hepanostika-Test ist eine spezielle 11-Kanal-Mikropipette (Preis ca. 1000,-- DM) erforderlich und - zumindest bei rationeller und exakter Durchführung einer größeren Anzahl von Bestimmungen - eine spezielle Absaug-Waschanlage (Preis ca. 10.000,-- DM).
Der Ausria-II-Test kommt nur dann in Betracht, wenn die entsprechenden Einrichtungen (Zählgerät, geeigneter Arbeitsplatz etc.) schon vorhanden sind.

Zeitaufwand, Handhabung

Hepanosticon Screening:	einfache Handhabung Inkubationszeit 3 h gesamter Zeitbedarf für 96 Bestimmungen (volle Besetzung eines Ablesesständers) ca 3 1/2 h

Spezifitätsanalyse:	die Durchführung erwies sich mit ihren vielen Einzelschritten als umständlich Inkubationszeiten insgesamt 20 h
Auscell Screening:	einfach in der Durchführung Inkubationszeit 1 1/2 h gesamter Zeitbedarf für 94 Bestimmungen (volle Besetzung einer Mikrotiterplatte) ca. 2 h
Spezifitätsanalyse:	einfach auszuführen Inkubationszeit 1 1/2 h
Hepatest Screening:	aufwendiger als Hepanosticon- oder Auscell-Test, da die Seren in einem eigenen Arbeitsgang erst in die erforderliche Gebrauchsverdünnung gebracht werden müssen; diese Mehrarbeit macht vor allem beim Arbeiten mit Mikrodiluter von Hand und bei einer größeren Anzahl von Bestimmungen den Vorteil der kürzeren Inkubationszeit zunichte. Inkubationszeit 30 - 60 Min. gesamter Zeitbedarf für 94 Bestimmungen (volle Besetzung zweier Mikrotiterplatten) ca. 1 1/4 h
Spezifitätsanalyse:	im Vergleich zu den anderen Tests aufwendiger, da Durchführung in zwei Schritten mit jeweils eigener Ab-

lesung erfolgt und häufig noch zusätzlich eine Absorptionsbehandlung nötig ist.
Inkubationszeiten insgesamt 90 Min. (Stufe I, II und Absorptionsbehandlung jeweils 30 Min.)

Hepanostika Screening: in der Handhabung - auch bei Benutzung der Absaug-Waschanlage- aufwendiger als die Hämagglutinations-Tests (genaues Einhalten der Inkubationstemperaturen und Enzymreaktionszeit, Lichtempfindlichkeit der Substratlösung, mehr Arbeitsgänge)
Inkubationszeiten insgesamt 5 h (erste Inkubation bei 37°C) bzw.19 h (erste Inkubation bei Raumtemperatur)
gesamter Zeitbedarf für 100 Bestimmungen (volle Besetzung einer Mikrotiterplatte) ca 6 h (erste Inkubation bei 37°C) bzw. ca 20 h (erste Inkubation bei Raumtemperatur)

Spezifitätsanalyse: im Vergleich zum Screening einige Arbeitsschritte mehr und zusätzliche Inkubationszeit von 2 h
Inkubationszeit insgesamt 7 h bzw. 21 h

Ausria-II Screening:	etwas einfacher zu handhaben als Hepanostika-Test Inkubationszeiten 3 h (erste Inkubation bei 45°C) bzw. 13 h (erste Inkubation bei Raumtemperatur) gesamter Zeitbedarf für 90 Bestimmungen ca 4 h bzw. 14 h außerdem ist zu berücksichtigen, daß bei der Auswertung je Probe eine Min. benötigt wird
Spezifitätsanalyse:	bis auf einige zusätzliche Arbeitsgänge und andere Inkubationszeiten wie Screening Inkubationszeiten insgesamt 6 h

Zusammenfassend läßt sich sagen,daß der Auscell-Test am einfachsten durchzuführen war. Der Hepanosticon-Test war im Screening zwar ebenso einfach, bei der Spezifitätsanalyse jedoch erheblich umständlicher. Der Hepatest erwies sich beim Arbeiten mit Mikrodiluter von Hand im Screening und besonders in der Spezifitätsanalyse als aufwendiger als der Auscell-Test. Durch Benützung eines Mikrodiluter-Systems ließe sich der Arbeitsaufwand sicher erheblich reduzieren. Im Vergleich zu den Hämagglutination-Tests haben der Ausria-II und Hepanostika-Test infolge ihrer längeren Inkubationszeiten vor allem den Nachteil des viel höheren Zeitbedarfs.

Ablesbarkeit
==========

Hepanosticon:	Agglutinationsmuster im allgemeinen gut ablesbar

Auscell: Agglutinationsmuster für "positiv" deutlich ablesbar. Bei schwach-positivem Ausfall mußte das jeweilige Agglutinationsmuster mit den Kontrollen verglichen werden. Insgesamt sehr sorgfältige Ablesung erforderlich, dafür jedoch keine Schwierigkeiten bezüglich der Einstufung schwach-positiv/negativ. Bei Ablesung nach 24 h bei undichter Abdeckung der Platte Gefahr der Falschablesung, da durch Eintrocknung Höfe entstehen können, die unscharfen Randsaum vortäuschen. Bei dichter Abdeckung jedoch gleichbleibendes Agglutinationsmuster für den gesamten angegebenen Ablesungszeitraum.

Hepatest: Agglutinationsmuster für "positiv" deutlich ablesbar. Schwierigkeiten jedoch bei der Beurteilung von schwach-positiven Ausfällen: die Grenze zwischen schwach-positiv/negativ war im Agglutinationsmuster nicht deutlich genug sichtbar. Auch waren bei Ablesung nach 30 Min. und 60 Min. teilweise deutliche Veränderungen in der Ausprägung des Agglutinationsmusters feststellbar. Spätere Ablesung erwies sich als unzuverlässig, deshalb sollte die Ablesezeit entsprechend den Angaben des Herstellers

nicht wesentlich überzogen werden. Im allgemeinen schien die Ablesbarkeit nach 60 Min. besser zu sein als nach 30 Min.

Hepanostika: Bei Vertiefungen mit nur schwacher Färbung war die Abgrenzung zwischen schwach-positiv/negativ manchmal nicht eindeutig möglich und vom subjektiven Farbempfinden des Beobachters abhängig. Daher im Bereich der Empfindlichkeitsgrenze öfters Schwierigkeiten bei der richtigen Einstufung. Auch bei entsprechender Verteilung auf der Platte z. B. starke Färbung neben schwacher Färbung war die richtige Einordnung erschwert.

Ausria II: Keine Schwierigkeit bei der Ablesung, da hier Zahlenwerte vorliegen. Diese erlauben einerseits eine sichere Grenze zwischen schwach-positiv/negativ zu ziehen und bieten trotzdem eine gewisse Flexibilität bei der Beurteilung eines Ergebnisses insofern, als man z. B. eine Probe mit einer Impulszahl nur knapp unter dem errechneten Grenzwert noch als positiv einstufen und in der Spezifitätsanalyse nachkontrollieren kann.

Im Vergleich untereinander war der Auscell und der Hepanosticon-Test einfach abzulesen. Der Hepatest bereitete dagegen besonders hinsichtlich der Unterscheidung schwach-positiv/negativ Schwierigkeiten. Auch der Hepanostika-Test ließ sich im Bereich seiner Empfindlichkeitsgrenze nicht immer eindeutig ablesen. Keine Schwierigkeiten gab es beim Ausria II, da hier nur Zahlenangaben auszuwerten sind.

E r g e b n i s s e d e r V e r d ü n n u n g s r e i h e n

Als sichere Nachweisgrenze für HB_sAg ergab sich beim Hepanostika-Test in der Verdünnungsreihe mit Normalserum (d.h. HB_sAg-freiem Serum) 1,5 - 2 ng für Subtyp ay und 2 ng für Subtyp ad (in der einen Verdünnungsreihe nur 5 ng Subtyp ad).
Mit NaCl als Verdünnungslösung lag die Nachweisgrenze bei 1 ng Subtyp ay und bei 1 - 2 ng Subtyp ad.

Im Ausria II lag bei der Verdünnungsreihe mit Normalserum die Nachweisgrenze für Subtyp ay bei 4 ng, für Subtyp ad bei 1 - 2 ng. Mit NaCl als Verdünnungsmedium verschob sich die Grenze auf 1 - 1,5 ng für Subtyp ay und 0,5 - 0,75 ng für Subtyp ad.
Insgesamt gesehen ließ sich also Subtyp ad etwas empfindlicher mit dem Ausria II-Test nachweisen, ay mit dem Hepanostika-Test.
Auffällig beim Ausria II war dabei der große Unterschied in den Empfindlichkeitsgrenzen für Subtyp ay zwischen der Verdünnungsreihe mit NaCl bzw. Normalserum.
Im Auscell-Test wurde als sichere Nachweisgrenze 2,5 - 5 ng

für Subtyp ay und 1,5 - 2 ng für Subtyp ad erreicht. In den Empfindlichkeitsgrenzen war fast kein Unterschied zwischen den Verdünnungsreihen mit NaCl bzw. Normalserum festzustellen.

Mit dem Hepatest waren 25 ng Subtyp ay gerade noch und 25 ng Subtyp ad sicher nachweisbar. 10 ng Subtyp ad war jedoch nicht mehr zuverlässig nachweisbar.

Der Hepanosticon-Test konnte bei der ersten Serie der Verdünnungsreihen (50 ng -) nicht einmal die oberste Stufe von 50 ng erfassen. Die zweite Serie der Verdünnungsreihen (10 ng-) wurde nicht getestet.

E r g e b n i s s e d e r S c r e e n i n g - U n t e r s u c h u n g

Zahlenmäßige Darstellung

I. Seren von Patienten der Würzburger Universitätskliniken (1000 Seren)

Ausria:

Im Screening reagierten 53 Seren positiv (47 eindeutig positiv, 6 schwächer positiv); in der Spezifitätsanalyse konnten davon 2 Seren als falsch-positiv ausgeschlossen werden. Von den 51 wahr-positiven Seren waren 50 deutlich positiv (darunter ein Serum, das nur im Ausria II-125 positiv reagierte), 1 Serum lag im Spezifitätstest nur um ca 10% über dem errechneten Grenzwert.

Hepanostika:

Im Screening reagierten 87 Seren positiv (73 eindeutig positiv, 14 schwächer positiv); 1 Serum, das im Ausria-

Test sowohl im Screening als auch in der Spezifitätsanalyse eindeutig positiv war, wurde dabei nicht erfaßt. In der Spezifitätsanalyse wurden von den 87 Seren 49 als wahr-positiv bestätigt, davon waren 45 deutlich positiv, 4 lagen an der Nachweisgrenze. Alle 49 Seren waren auch Ausria-positiv.
Zwischen Ausria und Hepanostika gab es also folgenden Unterschied:
1 Serum mit hoher Impulszahl im Ausria (Screening und Spezifitätsanalyse) wurde im Hepanostika-Screening nicht erfaßt und reagierte auch bei Wiederholung sowohl im Screening als auch im Spezifitätstest klar negativ, während es bei Wiederholung im Ausria-Test (Screening und Spezifitätsanalyse) deutlich positiv blieb. Dieses Serum war bei allen anderen Testmethoden stets negativ.
1 Serum, das im Ausria-Spezifitätstest nur um ca 10% über dem Grenzwert lag, wurde noch im Hepanostika-Screening erfaßt, jedoch in der Hepanostika-Spezifitätsanalyse nicht mehr als positiv erkannt. (Bei Wiederholung konnte es noch als positiv eingestuft werden).
Bei den falsch-positiven Reaktionen gab es zwischen Hepanostika und Ausria keine einzige Überschneidung.

Hepanosticon:

Im Screening reagierten 65 Seren positiv (29 Seren eindeutig positiv, 36 fraglich-positiv). Dabei wurden 26 Ausria/Hepanostika-positive Seren erfaßt. Von den fraglich-positiven Seren fielen bei Wiederholung im Screening 13 negativ aus. (Darunter 2 Ausria/Hepanostika-positive Seren). Die restlichen 23 Seren wurden zusammen mit den 29 eindeutig positiven nach Absorptionsbehandlung erneut geprüft. Dabei reagierten von den insgesamt 52 Seren 20 eindeutig positiv, 3 fraglich-positiv. Unter

diesen 23 Seren waren 20 Ausria/Hepanostika-positive, die 3 anderen Seren fielen bei Wiederholung im Hepanosticon-Screening wieder positiv aus, nach Absorptionsbehandlung jedoch negativ.
Bei Überprüfung ergab sich bei einem dieser 3 Seren im Hepanostika- und Ausria-Test eine schwach-positive Reaktion an der Nachweisgrenze, die jedoch kaum für den positiven Ausfall im Hepanosticon-Test verantwortlich gewesen sein dürfte.
Bei einem Vergleich mit den Impulsraten des Ausria-Testes zeigte sich, daß die Schwelle ab der ein Serum im Hepanosticon-Test zuverlässig positiv reagierte, bei etwa 7000 - 8000 Impulsen lag, also dem etwa 14-16-fachen des Grenzwertes (ca. 500 Impulse). Davon gab es nur zwei Ausnahmen:
1 Serum mit 10349 Impulsen wurde im Hepanosticon-Test überhaupt nicht erfaßt,
1 Serum mit 15237 Impulsen war nur im Screening positiv.

Auscell:

Im Screening reagierten bei Ablesung nach 1 1/2 h 68 Seren positiv (47 eindeutig positiv, 21 fraglich-positiv). Darunter befanden sich alle Ausria-positiven Seren bis auf zwei. Bei Ablesung nach 18 h gab es abgesehen von einigen Verschiebungen von fraglich-positiven jedoch Ausria-negativen Seren keinen Unterschied. Bei Wiederholung der 21 fraglich-positiven Seren fielen 10 negativ aus, darunter 1 Ausria/Hepanostika-positives Serum.
Die restlichen 11 Seren wurden zusammen mit den 47 eindeutig positiven des Screening-Testes in der Spezifitätsanalyse geprüft. Dabei wurden 33 Ausria/Hepanostika-

positive Seren als wahr-positiv bestätigt, 10 Seren waren negativ (darunter 1 Ausria-positives) und 15 Seren hatten in Test- und Kontrollreihe Agglutinationstiter über 1:128 (=Endstufe der Verdünnungsreihe). Es handelte sich bei diesen 15 Seren bis auf 1 Ausria/Hepanostika-negatives Serum um Seren mit hoher bis sehr hoher Impulszahl im Ausria-Test (ca. 6000 - 16000 Impulse). In einer zweiten Verdünnungsreihe von 1:64 bis 1:16000 fiel dieses eine Serum negativ aus und 2 andere Seren positiv. Die restlichen 12 Seren zeigten Agglutinationstiter von über 1:8000 oder 1:16000 und wurden deshalb in einer dritten Verdünnungsreihe von 1:8000 bis 1:250000 überprüft. Dabei waren 5 Seren positv, 7 Seren hatten (in Test- und Kontrollreihe) Agglutinationstiter von über 1:125000 oder 1:250000 und wurden deshalb nicht mehr weiter untersucht.

Der Auscell-Test erfaßte also im Screening alle Ausria-positiven Seren bis auf drei:

zwei Seren (eines davon im Ausria- und Hepanostika-Test gegensätzlich bewertet, das andere im Ausria- und Hepanostika-Test nur schwach-positiv) wurden im Screening überhaupt nicht erfaßt, ein Serum war im Screening fraglich-positiv, fiel dann jedoch bei der Wiederholung negativ aus.

Im Spezifitätstest fiel ein viertes, schwach Ausria-positives Serum (Hepanostika-negativ) negativ aus und 7 Seren (alle mit hoher Impulsrate im Ausria-Test) ließen sich wegen ihrer hohen, parallelen Agglutinationstiter in Test- und Kontrollreihe nicht eindeutig einordnen. Die restlichen 40 Ausria/Hepanostika-positiven Seren wurden auch im Auscell-Test als positiv erkannt.

Hepatest:

Beim ersten Screening wurden 315 Seren erfaßt. Nach Rücksprache mit der Firma Wellcome wurden diese 315 Seren nochmals im Screening wiederholt, da wahrscheinlich falsch gelagerte Reagenzien geliefert worden waren. Dabei reagierten dann 38 Seren positiv, 27 fraglich-positiv. 13 Ausria/Hepanostika-positive Seren waren hierbei nicht erfaßt worden. Die insgesamt 65 Seren wurden in der Spezifitätsanalyse Stufe I überprüft. 35 Seren zeigten größere Titerdifferenzen, 5 geringere Titerdifferenzen und 25 Seren gleiche Titer in Test- und Kontrollreihe.

Von den 65 Seren zeigten in der Spezifitätsanalyse Stufe II 36 Seren eine positive Reaktion (2 davon ganz schwach), 5 eine unspezifische Reaktion, ein Serum eine falsch-positive Reaktion und 23 Seren waren negativ. Die 36 positiven Seren waren alle auch Ausria/Hepanostika-positiv.

II. Seren Eisingen/Münnerstadt (800 Seren)

Ausria:

Im Screening wurden 28 Seren erfaßt und in der Spezifitätsanalyse als wahr-positiv bestätigt.

Hepanostika:

Im Screening wurden 31 Seren erfaßt (26 deutlich positiv, 5 schwächer positiv). In der Spezifitätsanalyse konnten davon 27 Seren als wahr-positiv bestätigt werden, 2 Seren fielen negativ aus, 2 weitere falsch-positiv, darunter ein Ausria-positives Serum. Dieses eine Serum fiel bei erneuter Nachprüfung in der Hepanostika Spezifitätsanalyse dann ebenfalls positiv aus.

Hepanostika und Ausria waren damit in den Ergebnissen nahezu identisch. Ein Serum lag bei beiden an der Nachweisgrenze.

Hepanosticon:

Im Screening reagierten 77 Seren (43 positiv, 34 fraglich-positiv). Bei Wiederholung der fraglichen fielen 24 negativ aus. Die restlichen 10 wurden zusammen mit den anderen 43 positiven nach Absorptionsbehandlung erneut untersucht. Dabei wurden 24 als positiv erfaßt (alle auch Ausria/Hepanostika-positiv).
Im Vergleich zum Ausria/Hepanostika-Test wurden 4 Seren nicht als positiv erkannt.Sie waren alle schon im Screening negativ ausgefallen.

Auscell:

Im Screening wurden 42 Seren erfaßt (33 positiv, 9 fraglich-positiv). Bei Wiederholung der fraglich-positiven Seren fielen 4 negativ aus. Von den restlichen 38 Seren konnten in der Spzifitätsanalyse 11 als positiv bestätigt werden, 11 Seren - eines davon im Ausria-Hepanostika-Test an der Nachweisgrenze - wurden als negativ eingestuft. 16 Seren mußten wiederholt werden, da die Agglutinationstiter in Test- und Kontrollreihe bei bzw. über 1:128 lagen. In der Wiederholung mit einer Verdünnungsreihe von 1:64 bis 1:250000 konnten davon 11 als positiv ermittelt werden. 5 Seren konnten nicht eindeutig eingestuft werden, da bei ihnen der Agglutinationstiter in Test- und Kontrollreihe bei 1:125000 bzw. darüber lag.
30 Seren, die wegen Verdacht auf nachträgliche Konta-

mination mit HB_sAg gesondert untersucht wurden, brachten folgendes Ergebnis:
Im Screening wurden alle Seren erfaßt (13 positiv, 17 fraglich-positiv). Bei Wiederholung der fraglich-positiven fielen 6 negativ aus. In der Spezifitätsanalyse konnten von den restlichen 24 Seren 20 als positiv identifiziert werden.

Hepatest:

Beim ersten Screening wurden 325 Seren erfaßt. Wie bei der ersten Screening-Serie (1000 Seren der Würzburger Universitätskliniken) wurden diese 325 Seren nochmals im Screening wiederholt. Dabei fielen dann 24 Seren positiv, 14 fraglich-positiv aus. Unter den insgesamt 38 Seren waren alle Ausria/Hepanostika-positiven Seren bis auf 3. Die 25 Ausria/Hepanostika-positiven Seren des Screening konnte alle auch in Stufe I und II der Spezifitätsanalyse bestätigt werden.

Von den weiter oben erwähnten 30 Seren (s. Auscell-Test) konnten 7 Seren als positiv erkannt werden.

Bei einer Nachuntersuchung dieser 30 Seren in den drei restlichen Nachweisverfahren konnten im Ausria II-125-Test 27 Seren, im Hepanostika-Test 18 Seren und im Hepanosticon-Test 1 Serum als positiv identifiziert werden.

Vergleichende Gesamtdarstellung
==========

Bei der Screening-Untersuchung zeigte der Ausria II die wenigsten unspezifisch positiven Reaktionen und entdeckte die größte Anzahl an positiven Seren, darunter 1 Serum, das

trotz hoher Impulszahl auch bei Wiederholung in allen anderen Testverfahren eindeutig negativ, im Ausria II dagegen eindeutig positiv reagierte.

Der Hepanostika-Test war bei der Untersuchung der ersten Screening-Serie (Seren von Patienten der Würzburger Universitätskliniken) fast ebenso empfindlich - er entdeckte, abgesehen von dem bereits erwähnten Serum, nur eines weniger - hatte aber eine deutlich höhere Anzahl an unspezifisch positiven Ergebnissen. Da in der Spezifitätsanalyse ein Großteil davon eindeutig negativ ausfiel und bei der nachfolgend untersuchten zweiten Screening-Serie (800 Seren aus Eisingen und Münnerstadt) der Anteil unspezifisch positiver Ergebnisse bedeutend niedriger lag, könnte das mit der noch nicht genügend eingeübten Ablese- und Arbeitstechnik zusammenhängen. Außerdem würde es Beobachtungen aus anderen Untersuchungen bestätigen, die auf einen Zusammenhang zwischen Frischezustand der Seren und falsch-positiven Reaktionen hindeuten.
Bei der Untersuchung der zweiten Screening-Serie zeigte sich bezüglich der Anzahl der als positiv erkannten Seren ein größerer Abstand zum Ausria II, der 10 Seren mehr entdeckte. Sie lagen alle bei sehr niedrigen Impulszahlen unter dem zweifachen des Grenzwertes (Grenzwert dabei 2,1-fache des negativen Mittelwertes).

Der Auscell-Test war unter den Hämagglutinationstests am spezifischsten und empfindlichsten. Bezüglich Spezifität war er dem Hepanostika-Test bei der ersten Screening-Serie deutlich überlegen, bei der zweiten dagegen etwas unterlegen. Dabei müssen jedoch die weiter oben angeführten Erwägungen berücksichtigt werden.

Bei der ersten Screening-Serie konnten in der Spezifitätsanalyse gegenüber 49 Seren beim Hepanostika-Test nur 40 Seren eindeutig als positiv identifiziert werden, während sich 7 weitere Hepanostika-positive Seren nicht klar einstufen ließen, da sie selbst bei hoher Verdünnung (1:500 000) in Test- und Kontrollreihe keine Agglutinations-Titer erkennen ließen. Diese 7 Seren hatten alle in Ausria II hohe Impulszahlen von 5680 - 15374 (entsprchend dem ca. 12 - 32-fachen des Grenzwertes) und waren auch in der Immundiffusion positiv. Nach den Erfahrungen dieser Arbeit lagen sie deshalb ganz sicher im Empfindlichkeitsbereich des Auscell-Testes. Eins von diesen Seren ließ sich auch im Hepatest nicht neutralisieren.
Bei der zweiten Screening-Serie wurden in der Spezifitätsanalyse im Vergleich zum Hepanostika-Test nur insgesamt 3 Seren weniger als positiv ermittelt. 5 weitere Seren konnten ähnlich wie bei der ersten Screening-Serie wegen ihrer hohen Titer nicht sicher eingeordnet werden. Auch diese Seren waren alle in der Immundiffusion positiv.

Der Hepatest erwies sich als etwas unspezifischer und als deutlich unempfindlicher im Vergleich zum Auscell-Test. Er entdeckte bei der ersten Screening-Serie 3 Seren weniger und ein positives Serum wurde als falsch-positiv eingestuft, da es sich nicht neutralisieren ließ. Es war jedoch in der Immundiffusion positiv und lag deshalb ohne Zweifel im Empfindlichkeitsbereich des Testes. Bei der zweiten Screening-Serie entdeckte der Hepatest 10 Seren weniger als der Auscell-Test.

Der Hepanosticon-Test war - wie aus den Ergebnissen zu ersehen ist - deutlich am unempfindlichsten. Er entdeckte in der ersten Screening-Serie von insgesamt 51 positiven Seren nur 20 und in der zweiten Screening-Serie von 55 positiven Seren nur 25.

IV. BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Ungeachtet absoluter Zahlenwerte zeigen die Ergebnisse aus der Verdünnungsreihen, daß Ausria II-, Hepanostika- und Auscell-Test von ihrer Empfindlichkeit her nahe beisammen liegen mit deutlichem Abstand zum Hepatest und sehr großem Abstand zum Hepanosticon-Test. Dies wird auch in der Screening-Untersuchung bestätigt. Hier ist zwar rein zahlenmäßig betrachtet ein deutlicher Abstand zwischen Ausria II und Hepanostika festzustellen, jedoch liegen die insgesamt 12 Seren, die im Ausria II zusätzlich als positiv ermitteltwurden, alle bis auf eines im niedrigen Impulszahlenbereich unter dem zweifachen des Grenzwertes. Es handelt sich also um sehr schwach-positive Seren. Wegen ihres ungewöhnlich hohen Anteils kann das Ergebnis rein zahlenmäßig interpretiert nicht als repräsentativ für eine normale Screening-Untersuchung betrachtet werden. Das beweist auch die große Differenz in den Ergebnissen zwischen erster und zweiter Screening-Serie mit dem sehr unterschiedlichen Anteil schwach-positiver Seren (Kriterium für schwach-positiv dabei Impulszahl des Ausria II-Testes). Von daher gesehen entspricht die erste Screening-Serie am ehesten den Verhältnissen in der Praxis. Die Überlegenheit des Ausria II-Testes könnte dabei neben seiner höheren Empfindlichkeit gegenüber Subtyp ad evtl. auch an der größeren Sicherheit bei der Auswertung im schwach-positiven Bereich liegen. Während die Ergebnisse bezüglich Hepanostika und Ausria II weitgehend auch in früheren Untersuchungen bestätigt werden (3-5, 11-12), erwies sich der Auscell-Test deutlich empfindlicher als bisher beschrieben (6). Dabei entsprechen die Ergebnisse aus der Screening-Untersuchung durchaus den Werten der Verdünnungsreihe, denn obwohl der Auscell-Test im Screening zahlenmäßig weniger Seren als positiv erkennt,

kommt er hier an Empfindlichkeit sogar dem Hepanostika-Test gleich. Der Unterschied in den Screening-Ergebnissen zwischen Hepanostika und Auscell wird nämlich nur durch die stark positiven Seren verursacht, die sich in der Spezifitätsanalyse nicht klar einordnen ließen.
Der Hepatest, dessen Empfindlichkeitsgrenze in den Verdünnungsreihen im Vergleich zu einer früheren Untersuchung ebenfalls niedriger lag (7), läßt einen größeren Abstand zum Auscell-Test erkennen. Die deutlich geringere Emfindlichkeit in den Verdünnungsreihen zeigt sich auch im Screening, besonders wenn man bei der Differenz zwischen den Ergebnissen beider Tests noch den durch die Nichteinstufbarkeit der ausschließlich stark positiven Seren beim Auscell-Test bedingten Ausfall berücksichtigt.Die höhere Empfindlichkeit des Auscell-Testes wird auch in einer früheren Arbeit bestätigt, deren Verfasser allerdings bei der Screening-Untersuchung wegen Schwierigkeiten in der Auswertung des Auscell-Testes bessere Resultate mit dem Hepatest erzielten (6-7). Der Hepanosticon-Test weist sich mit allen seinen Ergebnissen als unempfindlichstes Verfahren aus.
Unter Berücksichtigung aller Kriterien erweist sich der Auscell-Test deutlich als bester Hämagglutinationstest. Er ist bezüglich seiner Screening-Ergebnisse mit dem Hepanostika-Test vergleichbar, zeigt jedoch in der Spezifitätsanalyse Schwierigkeiten bei der Identifizierung stark-positiver Seren. Der Hepatest hat ihm gegenüber den Nachteil der geringeren Empfindlichkeit und ist, besonders in der Spezifitätsanalyse, aufwendiger. Sein Vorteil - die kürzere Inkubationszeit - dürfte erst dann zur Geltung kommen, wenn die Durchführung nicht wie bei vorliegender Untersuchung mit Mikrodiluter von Hand erfolgt, sondern unter Verwendung einer entsprechenden Dilutereinrichtung. Der Hepanosticon-Test muß heute von seiner Empfindlichkeit

her als für Screening-Zwecke ungeeignet angesehen werden. Der Ausria-II-Test erwies sich als bestes Verfahren. Er war im Screening im Vergleich zum Hepanostika-Test gemessen an der Anzahl der als positiv erkannten Seren etwas empfindlicher und deutlich spezifischer, während die Ergebnisse aus den Verdünnungsreihen auf eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Subtyp ay und eine etwas höhere bezüglich Subtyp ad hindeuten. Der Vorsprung des Ausria II-Testes im Screening könnte daher unter anderem mit der größeren Häufigkeit des Subtyps ad in Nordwesteuropa zusammenhängen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Fünf verschiedene Testverfahren der III. Generation zum Nachweis von HB_sAg im menschlichen Serum wurden in je 1800 Screening-Untersuchungen und in verschiedenen Verdünnungsreihen nebeneinander geprüft. Es handelte sich bei diesen Verfahren um drei Hämagglutinationstests (Auscell, Hepatest, Hepanosticon), einen Enzymimmunoassay (Hepanostika) und einen Radioimmunoassay (Ausria II-125). Dabei erwies sich in der Screening-Untersuchung der Ausria II-125 als empfindlichstes und spezifischstes Verfahren vor dem Hepanostika-Test. In den Verdünnungsreihen reagierte dagegen hinsichtlich Subtyp ay der Hepanostika-Test am empfindlichsten, gegenüber Subtyp ad der Ausria II-125. Der Auscell-Test erwies sich deutlich als bester Hämagglutinationstest sowohl im Screening als auch in den Verdünnungsreihen. Er kam mit seinen Screening-Ergebnissen insgesamt dem Hepanostika-Test gleich und erreichte auch dieselbe Empfindlichkeit bezüglich Subtyp ad, während gegenüber Subtyp ay die Empfindlichkeit unter der des Hepanostika- und Ausria II-125-Testes lag.

Zum Nachweis von HB_sAg empfiehlt sich von diesen Ergebnissen her an erster Stelle der Ausria II-125-Test, sofern die entsprechenden Einrichtungen dafür vorhanden sind, oder aber - mit geringerer Spezifität - der Hepanostika-Test.
Kann keiner dieser beiden Tests durchgeführt werden, erscheint der Auscell-Test am geeignetsten, der bezüglich Empfindlichkeit mit nur geringem Abstand folgt.

VI. TABELLEN

Ergebnisse der Screening-Untersuchung

A) Erste Screening-Serie (1000 Seren von Patienten der Würzburger Universitätskliniken)

	positiv	
	im Screening	in der Spezifitätsanalyse
Ausria II	53	51[2]
Hepanostika	87	49
Hepanosticon	65/52[1]	20
Auscell	68/58[1]	40/47[3]
Hepatest	315/65*	36/37[4]

1) Nach Wiederholung der fraglich-positiven Ergebnisse
2) davon 1 Serum mit hoher Impulszahl nur im Ausria II positiv, in allen anderen Testverfahren eindeutig negativ.
3) 7 Seren nicht eindeutig einstufbar wegen zu hoher Agglutinationstiter
4) 1 Serum als falsch-positiv eingestuft.

B) Zweite Screening-Serie (800 Seren aus Eisingen/Münnerstadt)

1.) einschließlich Ergebnisse aus Nachuntersuchung (s. S. 34)

	positiv	
	im Screening	in der Spezifitätsanalyse
Ausria II	55	55
Hepanostika	52	45
Hepanosticon	86/57[1]	25
Auscell	72/62[1]	42/47[2]
Hepatest	341/48*	32

1) Nach Wiederholung der fraglich-positiven Ergebnisse
2) 5 Seren nicht eindeutig einstufbar wegen zu hoher Agglutinationstiter.

* Nach Wiederholung, da wahrscheinlich falsch gelagerte Reagenzien verwendet worden waren.

2.) ohne Berücksichtigung der Nachuntersuchung

	positiv	
	im Screening	in der Spezifitätsanalyse
Ausria II	28	28
Hepanostika	31	27
Hepanosticon	77/53[1]	24
Auscell	42/38[1]	22/27[2]
Hepatest	325/38*	25

1) nach Wiederholung der fraglich-positiven Ergebnisse
2) 5 Seren nicht eindeutig einstufbar wegen zu hoher Augglutinationstiter

* nach Wiederholung, da wahrscheinlich falsch gelagerte Reagenzien verwendet worden waren.

3.) Ergebnisse der Nachuntersuchung

	positiv	
	im Screening	in der Spezifitätsanalyse
Ausria II	27	27
Hepanostika	21	18
Hepanosticon	9/4[1]	1
Auscell	30/24[1]	20
Hepatest	16/10[1]	7

1) nach Wiederholung der fraglich positiven Ergebnisse

Ergebnisse aus den Verdünnungsreihen (ng/ml)

		Hepanostika		Ausria II-125		Auscell		Hepatest		Hepanosticon	
		NaCl	Serum	NaCl	Serum	NaCl	Serum	NaCl	Serum	NaCl	Serum
V I	ay	1	2-5	1	(5)[1]	5	5	25	25	-	-
	ad	2	5	0,5	(2)[1]	2	1	10	25	-	-
V II	ay	1	1,5	1,5	4	2,5	2,5	-	-	nicht getestet	
	ad	1	2	0,75	1	1,5	1	-	-		

1) Grenzwert hier ca. 1,8-fache des negativen Kontroll-Mittelwertes

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BLUMBERG, B.S., ALTER, H.J., VISNICH, S.:
A "new" antigen in leukemia sera
J. Amer. med. Ass. 191 (1965), 541-546

2. BLUMBERG, B.S., GERSTLEY, B.J.S., HUNGERFORD, D.A., et al:
A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis
Ann.intern. Med. 66 (1967), 924-931

3. HANSSON, B. G., JOHNSSON, T., NORDENFELT, E.:
Enzyme-immunoassay for HB_s-Ag
Lancet, October 23, (1976) 915

4. HOPKINS, R., ROSS, S., JORDAN, T., WATT, A.D.:
Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay for detecting hepatitis B surface antigen in serum from freshly donated blood and selected blood products
J. Clin.Pathol. 31 (1978) 1000 - 1002

5. KACAKI, J., WOLTERS, G., KUIJPERS, L., STULEMEYER,S.:
Results of a multicentre clinical trial of the solidphase enzyme immunoassay for hepatitis B surface antigen
Vox.Sang. 35:, (1978) 65-74

6. LANGE, W., KÖHLER, H., APODACA, J.:
Der Nachweis von Hepatitis-B-(Surface-) Antigen
Dtsch. med. Wschr. 100 (1975), 508-512

7. LANGE, W., KÖHLER, H., APODACA, J.:
Der Nachweis von Hepatitis-B-(Surface-) Antigen mit dem Hepatest
Dtsch. med. Wschr. 101 (1976), 1273-1276

8. LONDON, W.T., SUTNICK, A. I.,BLUMBERG, B.S.:
Australia antigen and acute viral hepatitis
Ann. intern. Med. 70 (1969), 55-59

9. PRINCE, A.M.:
Relation of Australia and SH antigens
Lancet II (1968), 462-463

10. PRINCE, A.M.:
Relation between SH and Australia antigens
New Engl. J. Med. 280 (1969), 617-618

11. WOLTERS, G., KUIJPERS, L.P.C., SCHUURS, A.H.W.M., KACAKI, J.:
Enzyme-immunoassay (EIA) of hepatitis B surface-antigen (HB_s -Ag)in microtiter-plates
Z. Anal. Chem. Band 279, Heft 2 (1976), 144

12. WOLTERS, G., KUIJPERS, L., KACAKI, J., SCHUURS, A.:
Solid-phase enzyme-immonoassay for detection of hepatitis B surface antigen
J. Clin. Pathol. 29 (1976), 873-879

Herrn Prof. Dr. med. D. W i e b e c k e danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H.A. K ü h n möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Den Abbott Laboratories, der Organon-Teknika GmbH und der Wellcome GmbH danke ich für die Bereitstellung der Tests zur Vergleichsuntersuchung.

L E B E N S L A U F

Geboren am 13. Februar 1953 in Würzburg
Vater: Rudolf Endrich
Mutter: Agnes Endrich, geb. Konrad

1964 - 1973 Besuch des Siebold-Gymnasiums in Würzburg
- Schulabschluß mit Abitur -

1973 Aufnahme des Studiums der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1975 Ärztliche Vorprüfung

1976 erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1978 zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Arno Endrich